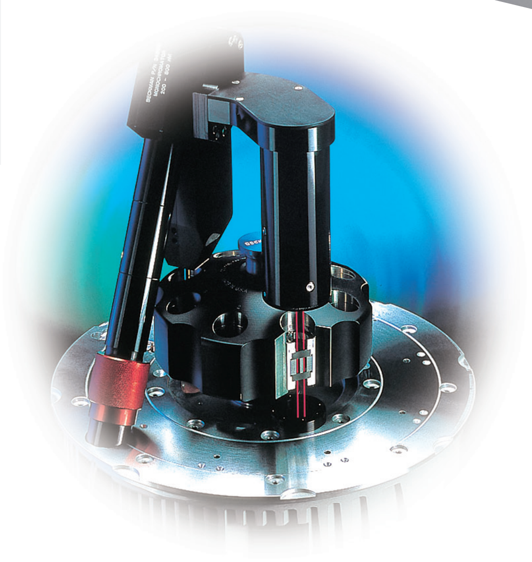
BECKMAN COULTER

# 分析用超遠心システム
# ProteomeLab XL-A / XL-I



タンパク質やナノ粒子の
分子量・形状・分子間相互作用・
凝集塊の有無を溶液中で解析

Brilliance
*at every turn.*

# そのタンパク質は本当にモノマーでしょうか?

精製されたタンパク質の4次構造は、重要な情報です。
たとえば医薬品応用目的で精製されたタンパク質は、モノマー・ダイマー・・・・オリゴマーの状態でその作用が変わります。
場合によっては大きな凝集体となり、免疫原性の問題を案じなければならない場合もあります。
精製されたタンパク質が期待された作用や特異的結合能を持っていた場合も、その作用はどのような高次構造をとった場合に発揮されるのかが次に続く解析のポイントとなります。

## 溶液のままで、溶質の分子サイズを測定する超遠心分析法

これらの解析は、溶液中で溶質として存在する高分子の大きさ(分子量)や形状と関連します。超遠心分析法は、溶質の分子量をそのまま直接測定でき、分子間相互作用に基づく高分子の機能解析に大きく貢献します。担体との相互作用による測定方法と異なり、物理化学に基づいた本来の物性値が求められます。
対象となる分子量は数百~数百万Daと幅広く、ペプチドからウィルスをカバー、濃度は数μg/mL ~数十mg/mLの広範囲をカバーします。

## 沈降現象の解析:上清と沈殿の間に存在する情報の宝庫

通常遠心機は、溶質と不溶物を上清と沈殿として分離しますが、サイズ的にその中間に位置する高分子溶質は、相応の重力がかかると沈降します。すなわち、遠心の中心から外側へ向かって溶液中を移動します。
この沈降速度は与えられた重力、周辺の溶媒との摩擦、そして溶液中での拡散により決まり、溶質の分子量を反映するとともにその形状の影響を受けます。従ってこの現象を詳細に解析すれば、高分子溶質の性状に関する情報を得ることができます。

## 沈降をモニタする … 遠心中に中が覗ける遠心機

分析用超遠心システム ProteomeLab XL-A / XL-I は、このモニタリングのために開発された特殊遠心機です。試料溶液は、回転中心を起点とする扇型のセルに入れます。セルの上下は光透過が可能なガラスです。この特殊セルを組み込むロータの上下には光学系が装備されており、超高速回転中にタイミングを合わせて測定光を透過させ、セル内の光学的変化(すなわち沈降現象)をモニタします。通常の分離用遠心機を超えた機能を持つ、もう一つの意味での超遠心システムです。

## 測定対象溶質は天然(native)のまま … 測定のための人工的変化がありません。

この方法によって得られる情報は、高分子試料が溶液中に存在したままの天然な状態に基づき、他の方法で必要となる担体との相互作用の影響を受けません。また担体に固定される場合に起こりうる、構造変化や作用部位への妨害もありません。
生体高分子なら、生体中で作用しているそのままの状態を反映させた結果が得られます。

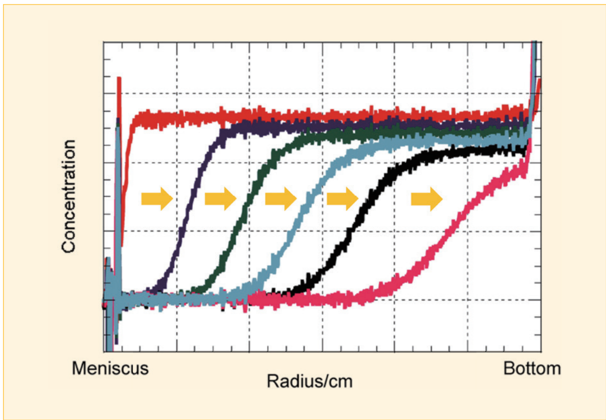
## データ解析ソフトウエアの充実と、ナノ粒子解析への応用

近年、センターピース(3ページ参照)等の改良により、本システムのデータ精度が向上しています。また第三者機関によるデータ解析ソフトウエアの開発が充実し、データから引き出せる情報が質・量ともに向上しています。これに伴い、バイオ医薬品製剤なら0.1%レベルでのタンパク質会合体の存在も検出されるようになりました。
システムおよび解析ソフトウエアの充実は、ナノ粒子のサイズ分布・物性解析ツールとしての価値も高めています。レーザ散乱解析などの統計的手法と異なり、それぞれのサイズ・密度の粒子群の存在を見い出し、それらを積み重ねての解析であること、サイズだけでなく分子量や密度も考察できることから、サンプルの全体像に新たな情報を追加します。

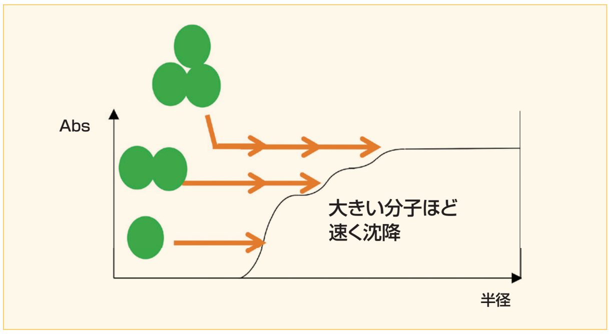
# 超遠心分析法における二つの解析法

## 時間を追って沈降をリアルタイムモニタ：沈降速度法

装置を高速で回転させ、高分子が沈降する様子を時間を追ってモニタする方法です。
試料溶質が均質な場合はセル内全体の溶質が等しい速度で沈降し、沈降界面（沈降現象により、溶質の無くなったゾーンと溶質が存在するゾーンの境界面）は拡散の影響から一つのS字型を描きつつ移動します（**図A**）。この界面の解析から、沈降係数と拡散係数を求め、溶質の分子量を導きます。
異なる沈降係数を持つ溶質が存在する場合は、沈降界面は複数のS字型より合成された形になります（**図B**）。従ってこの沈降界面を解析することで、たとえば精製されたタンパク質溶液なら4次構造（すなわち会合）レベルの多様性が解析できます。
この解析方法をそのまま応用できるのが、IgG抗体などの糖タンパク質を主薬とするバイオ医薬品の会合体チェックです。ダイマー以上の会合体の割合を0.1%レベルで検出します。
また合成ナノ粒子のサイズ分布・物性解析にも応用できます。
沈降は、高分子溶質と溶媒の間の摩擦にも影響されます。このことから、高分子溶質の形状に関して情報を得ることができます。タンパク質またはタンパク質核酸複合体のフォールディング状態や、タンパク質ヘテロ複合体の結合部位に関する解析などに応用されています。



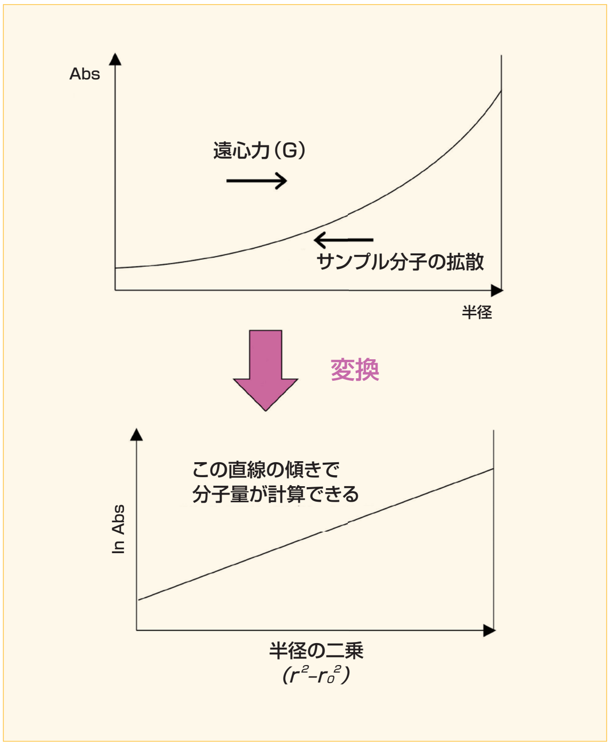

**図A　沈降速度法のデータ例**
➡のように沈降界面が移動していく様子をモニタします。




**図B　精製タンパク質の一部が会合した場合の沈降速度法データイメージ**
大きな会合体ほど速く沈降し、沈降界面に段階が生じます。

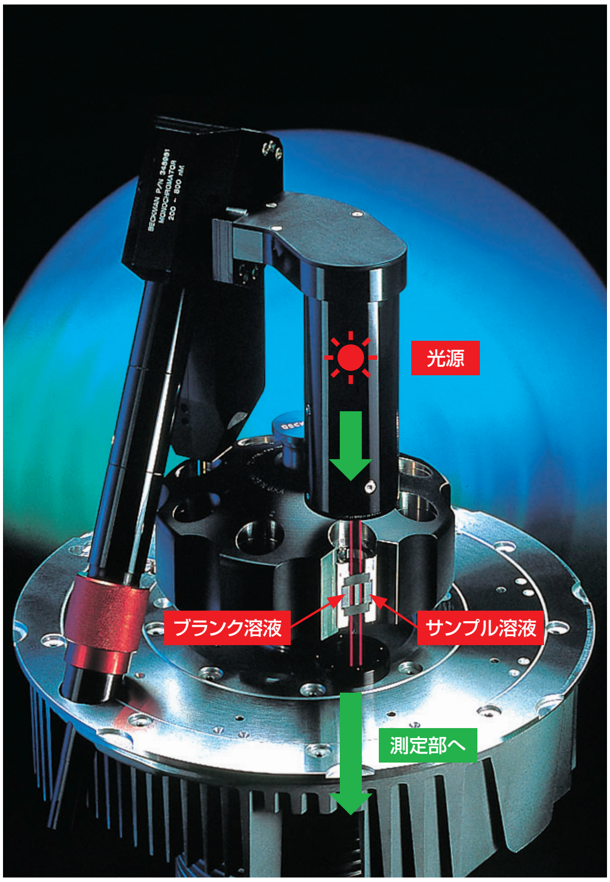
## 重力と拡散のバランスが釣合った世界：沈降平衡法

回転数を落としていくと拡散の影響が強くなり、やがては沈降と拡散のバランスが釣合った定常状態となります。この時のセル内の高分子濃度は回転中心側から徐々に濃度が高くなるカーブを描きます（**図C上**）。このカーブの縦軸を対数、横軸を半径の2乗に変換して得られる直線の傾きは、溶質の分子量を反映します（**図C下**）。定常状態のため摩擦の影響が無く、より正確な溶質分子量が求められます。
この値とモノマーの分子量の関係から、溶質が何量体であるかが求められます。ヘテロ会合体なら比率だけでなく、量論的（一つずつの二量体か、二つずつの四量体かなど）に解析できます。
また沈降平衡法は複数の溶質が共存する場合には、これらが単なる混合状態なのか、会合平衡状態なのかを判断でき、その結合定数を求めることも可能です。




**図C　沈降平衡法におけるデータ解析イメージ**
上 生データは遠心力と拡散現象のバランスにより、濃度カーブを描きます。
下 上図を変換して得られる直線の傾きは、分子量に相関します。

# 数万rpmの回転中に、セルの中を覗く仕組み！




**光源系の機構**（レイリー干渉測定）

## セル、ロータ、光学系

上下が光透過できる特殊セルは、沈降速度法･沈降平衡法それぞれに合わせたデザインが用意されています。試料溶液量は速度法で400 μL、平衡法では150 μL程度が標準です。目的により条件（pH、イオン強度、温度、試料濃度）を変えての測定が簡単にセットできます。測定後の試料溶液は、回収して別条件での測定や、他の解析装置での測定に利用できます。

ロータは4個または8個（紫外･可視吸収測定の場合は3個または7個）のセルが同時に回転できる2種があります。どちらのロータも数万rpmでの高速回転中にその回転角度を随時装置に伝え、測定のタイミングを確実にしています。

測定部はロータを挟む形で上方に光源、下方に測定部を持ち、ロータから伝えられるタイミングに合わせてデータを取り込みます。紫外･可視吸収測定の場合は、指定された波長でロータの半径方向にセル内をスキャンします。

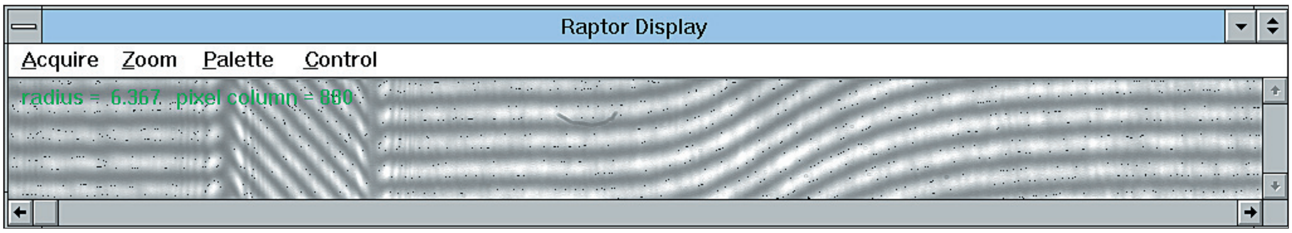
**センターピース（ダブルセクター）**
セルの中心となる部品です。片側にサンプル、もう一方にはレファレンスとしてブランク溶液を入れます。主に沈降速度法に用います。近年整形精度にも改善が加えられ、データの精度向上に寄与しています。
高濃度試料用に光透過行路長を短くしたタイプ（通常センターピース12 mmに対して3 mm）もあります。

**センターピース（6チャンネル）**
沈降平衡法に用います。3サンプルが同時に測定できます。同一サンプルに対して条件（塩濃度･pH･濃度･添加物など）を変えての測定にも便利です。

## 2つの測定方法：紫外･可視吸収とレイリー干渉

分析用超遠心システムには2つのモデル、ProteomeLab XL-AとProteomeLab XL-I があります。XL-Aは190～800 nmの紫外･可視域での吸収検出専用、XL-I はこれに加えてレイリー干渉光学系が備えられ、特に紫外線吸収の乏しい試料や、高濃度の試料に対してノイズの少ない確実なデータを提供します。

**An-50Ti 8穴ロータ**
8個（紫外･可視吸収測定の場合は7個）のセルが同時に回転できます。沈降平衡法では最大24サンプルを、沈降速度法では最大8サンプル（紫外･可視吸収測定の場合はそれぞれ21サンプル、7サンプル）を同時測定可能です。




**ProteomeLab XL-I レイリー干渉光学系による測定データ**
沈降速度法の例で、右側中央部に沈降界面が現れているのがわかります。この生データを変換し、紫外･可視吸収検出データと同様に解析を行います。

Protein Heterogeneity

# タンパク質の4次構造における多様性解析

## 沈降速度法

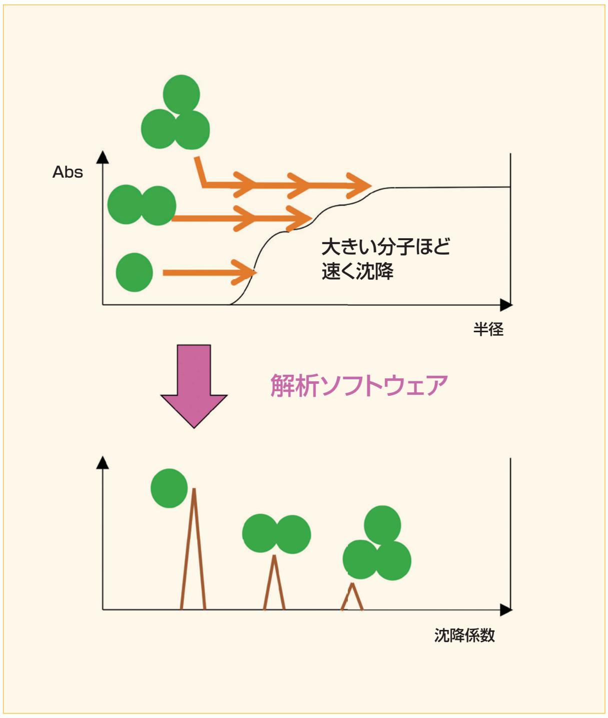
### ダイマー・トリマー・・・はどのくらいありますか?

4次構造レベルにおける多様性、すなわち会合体の存在割合の評価は、特にバイオ医薬品においては開発研究･品質管理／保証において非常に重要です。会合体の存在はその薬効に影響を及ぼします。

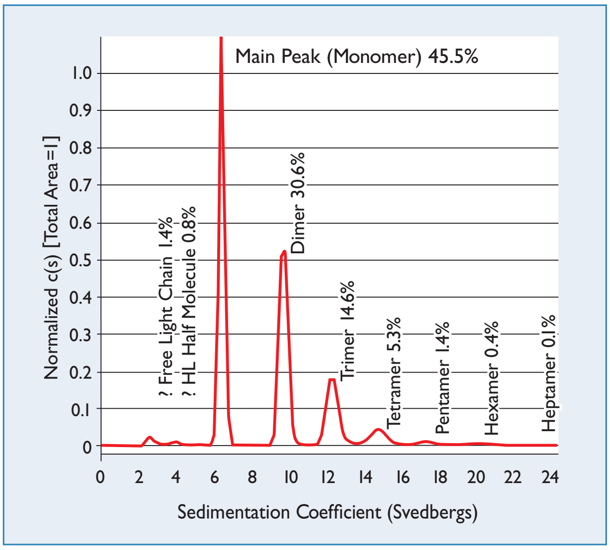
会合体が部分的に構成されている場合は、沈降係数において多様性が生じ沈降界面は複数のS字型を複合させた形になります。この界面を解析プログラムにより沈降係数における分布のグラフに変換することで、会合状況が明確に解析できます（**図A**）。

**図B**は、過酷状態にさらされたモノクローナル抗体の沈降パターンを第三者機関の解析ソフトウェアにより沈降係数の分布図とし、各会合体の存在割合を解析した事例で、会合に伴う多様性のプロファイルが一目でわかります。モノマーに対して会合状態の割合が的確に求められます。

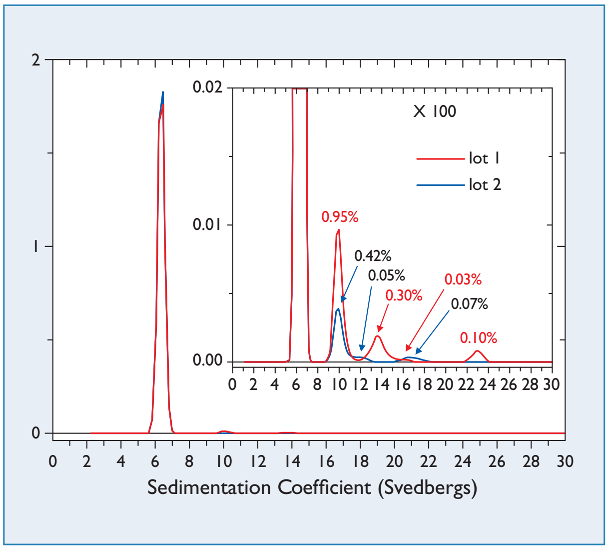
**図C**は、製造直後のモノクローナル抗体の沈降パターンから、2つのロットの違いを解析したものです。2％未満の会合体の存在が確実に検出されるとともに、会合状況の違いも評価できます。0.1%未満の会合体の存在も見い出せます。




**図A　沈降速度法におけるデータ解析イメージ**
得られた沈降界面データを、解析ソフトウエアにより沈降係数の分布図に変換したイメージです。モノマーおよび各会合体が定量的に解析できるようになります。




**図B　過酷試験後のモノクローナル抗体試料の沈降係数分布**




**図C　製造直後のモノクローナル抗体試料の沈降係数分布**

Source J. S. Philo, Ph. D,
Alliance Protein Laboratories.

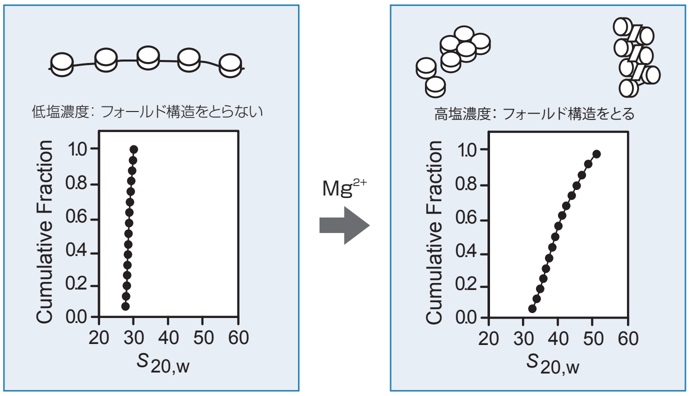
Molecular Conformation

# 高次構造解析　沈降速度法

## 適切にフォールドされていますか?

バイオ医薬品においては、主成分高分子の高次構造の確認が重要です。前臨床段階では、リコンビンナントタンパク質が適切な高次構造をとっているかの評価が必要です。この評価を通じて最適な産生細胞や製造プロセスが選択されます。

オリゴヌクレオソームについて、溶液の塩濃度と高次構造の相関の解析事例です。TE（Tris / EDTA）バッファ中では27～30 Sの沈降係数を示しました（**左図**）が、1.8 mM塩化マグネシウム溶液中では33～52 Sとなりました（**右図**）。双方の溶液中における分子量が同じであることは沈降平衡法で確認され、高塩濃度溶液中でよりコンパクトな高次構造をとることが示されました。



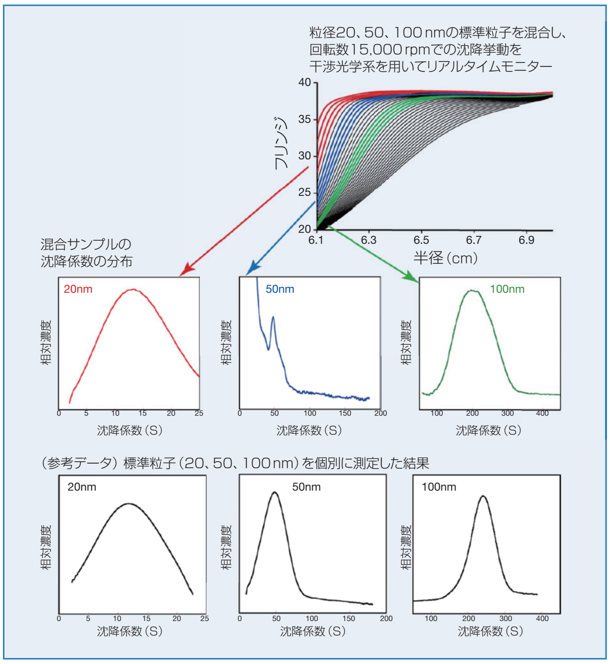

Source:Jeffrey C. Hansen, Ph. D.
Dept. of Biochemistry, University of Texas
Health Science Center, SanAntonio, Texas, USA.

Nano Particle Size Distribution

# ナノ粒子のサイズ分布解析　沈降速度法

## 合成ナノ粒子のサイズはどのくらい均質ですか?

超遠心分析法は合成ナノ粒子の評価にも応用できます。
20、50、100 nmの標準粒子を混合しての沈降速度法の結果（レイリー干渉光学系による検出）では、各時間帯の沈降状況から3種の異なる沈降係数を持つグループが沈降している様子が確認できました。また、これらの沈降係数分布はそれぞれのサイズの粒子を個別に測定した結果とよく相関しました。




本データは大阪大学大学院工学研究科　内山進先生のご好意により、ご提供いただきました。

本システムの改良に基づくデータの高精度化と、近年の第三者機関による沈降速度法データ解析ソフトウエアの発展により、ナノ粒子についても、沈降係数と拡散係数から粒子の分子量(重さ)あるいは密度、さらにはサイズ分布を的確に求められるようになりました 。超遠心分析より得た情報に基づいた構造･物性解析も展開されており、たとえばコアの周辺に異なる化学構造のシェルが付加されている場合に、両者の密度の違いからコアの直径とシェルの厚みを求めた事例も報告されています。

参照

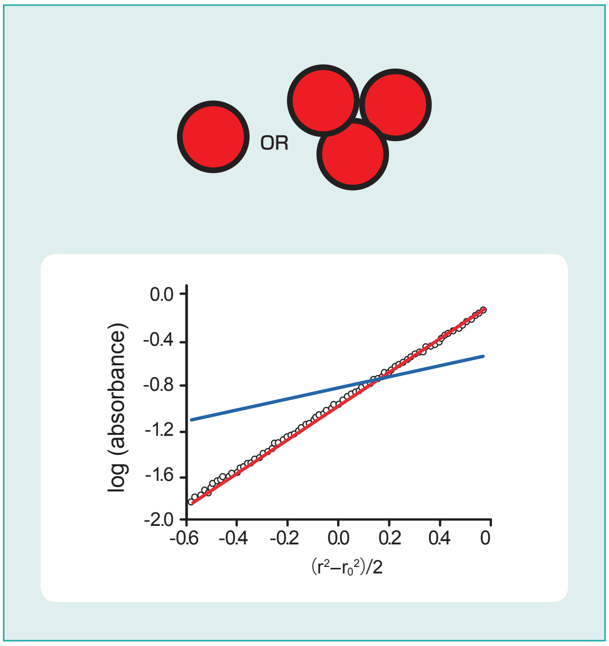

Carney, R.P. et al. Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nat. Commun.* 2:335 doi: 10.1038/ncomms1338 (2011)

Stoichiometry

# 量論解析　沈降平衡法

## 何量体で存在していますか？

腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor）の配列ホモログ（sequence homolog）に関する解析事例です。このタンパク質ファミリーにおける類似性より、三量体を構成すると予測されましたが、サイズ排除クロマトグラフィーでの解析結果はモノマー相当でした。従って、大腸菌における発現過程での高次構造形成が適切でなく、三量体を構成できない可能性もありました。
沈降平衡法解析より得られたプロットは三量体の予測ライン（赤）にぴったりフィットし、モノマーの予測ライン（青）からは明らかに外れ、適切な三量体が構成されていることが明らかになりました。



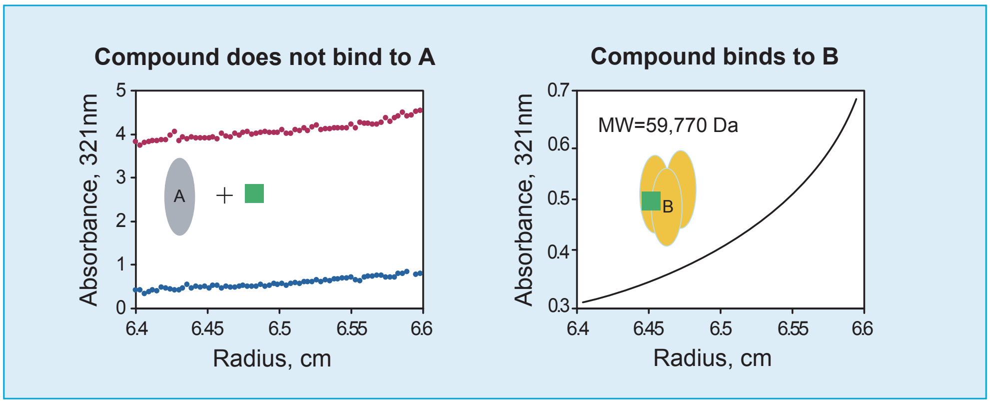

Source: J. S. Philo Ph. D., Alliance Protein Laboratories

Interacting Systems

# 低分子の高分子への結合解析　沈降平衡法

## 阻害剤はどちらのタンパク質に結合していますか？

低分子薬物がターゲットタンパク質に結合してその作用を発揮するにあたり、複数のターゲットがある場合はどのタンパク質に結合するかは重要な情報です。
ホルモンとその受容体の結合に対する阻害剤（Inhibitor、■）の作用機序を調べた事例です。この阻害剤は321nmに吸収を持ち、非結合状態では沈降しませんが、タンパク質と結合した状態ではタンパク質の分子量に従って沈降し、その結果が321nmの吸収パターンに現れます。
左図は受容体（A）のみ（青、受容体は321nmに吸収は無い）および受容体と阻害剤の混合液（赤）、右図はホルモン（B）と阻害剤の混合液の沈降平衡法の結果です。右図のみに阻害剤が高分子と結合したことを示すカーブが形成され、ホルモンと結合していることがわかりました。




Source: Michelle Arkin Ph. D., Sunesis Pharmaceuticals, Inc.

# 分析用超遠心システム ProteomeLab XL-A / XL-I

## 主な仕様

| | |
|---|---|
| 最高回転数 | 60,000 rpm |
| 最大遠心力 | 290,000 g（An-60Ti使用） |
| 速度制御精度 | ±20（1,000 rpmから最高速度まで） |
| 駆動部保証 | 完全10年保証 |
| 設定温度 | 0℃～40℃まで1℃刻み |
| 温度制御精度 | ±0.5℃ |
| 波長範囲 | 190 nm ～800 nm |
| 干渉計波長 | 660nm |
| 分子量範囲 | $10^{2}$～$10^{6}$ Da |
| 濃度範囲（吸光度） | 5 μg/mL ～ 約1-2 mg/mL※1 |
| 濃度範囲（干渉） | 25 μg/mL ～ 約4-5 mg/mL※2 |
| 結合（解離）定数範囲、$K_d$ | $10^{-3}$M～$10^{-8}$M |
| 寸法 | 940（W）×673（D）×1,207（H）mm（PC含まず） |
| 重量 | 465 kg |
| 電源 | 単相200 V、50 / 60 Hz、30 A |

ProteomeLab XL-I

※1 沈降平衡法により、波長190 nmにおいて10 mM $NaPO_4$、0.15 MKF、pH7に溶解した5μg/mLの黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）（4.16 μM）を測定しています。
※2 沈降平衡法により、10 mM MOPS, 0.15 M NaCl、pH7.5に溶解した4 mg/mLのウシ血清アルブミン（BSA）（58 μM）を測定しています。

## ProteomLab XL-A / XL-I システムパッケージ　測定方法および主要構成品

| システムパッケージ | 測定方法 | ロータ | 12mmダブルセクターセンターピース（個数） | 3mmダブルセクターセンターピース（個数） | 6チャンネルセンターピース（個数） |
|---|---|---|---|---|---|
| XL-A ベーシック | 紫外・可視吸収 | An-60Ti 4穴ロータ | Epon Chacoal-Filled（3） | ― | ― |
| XL-A パッケージA | 紫外・可視吸収 | An-60Ti 4穴ロータ | Epon Charcoal-Filled（3） | ― | Epon Charcoal-Filled（3） |
| XL-A パッケージB | 紫外・可視吸収 | An-60Ti 4穴ロータ<br>An-50Ti 8穴ロータ | Epon Charcoal-Filled（7）<br>Epon Aluminum-Filled（7）<br>アルミニウム（7） | Epon Charcoal-Filled（7） | Epon Charcoal-Filled（7） |
| XL-I パッケージA | 紫外・可視吸収、レイリー干渉 | An-60Ti 4穴ロータ | Epon Charcoal-Filled（4） | ― | Epon Charcoal-Filled（4） |
| XL-I パッケージB | 紫外・可視吸収、レイリー干渉 | An-60Ti 4穴ロータ<br>An-50Ti 8穴ロータ | Epon Charcoal-Filled（8）<br>Epon Aluminum-Filled（8）<br>アルミニウム（8） | Epon Charcoal-Filled（4） | Epon Charcoal-Filled（8） |

## ProteomLab XL-A / XL-I 用 ロータ 仕様

| ロータ | An-60Ti 4穴ロータ | An-50Ti 8穴ロータ |
|---|---|---|
| 最高回転数（rpm） | 60,000 | 50,000 |
| 最大重力（xg） | 290,600 | 201,600 |
| 最大サンプル数　紫外・可視吸収測定時（レイリー干渉測定時） | | |
| ダブルセクター | 3（4） | 7（8） |
| 6チャンネル* | 9（12） | 21（24） |

*6チャンネルセンターピースは沈降平衡法にのみ使用可能です。

An-50Ti 8穴ロータ

Beckman CoulterおよびBeckman CoulterロゴはBeckman Coulter, Inc.の登録商標です。
EponはShell Chemical社の登録商標です。
他の会社名、製品名およびサービス名は、それぞれの所有する商標です。

仕様・外観については、予告なしに変更する場合があります。あらかじめご了承ください。

**注意** 正しく安全にお使いいただくために、ご使用の前に必ず「取扱説明書」をお読みください。

**ベックマン・コールター株式会社**

本　　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460
e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp

B01002 2015.04-1000（L）